



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CAMPUS II – AREIA-PB
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

VINÍCIUS TOMÉ DOS SANTOS SOUZA

**Efeito dos anticoagulantes EDTA e heparina sobre a fragilidade osmótica
eritrocitária em amostras de sangue de galinhas (*Gallus gallus domesticus*)**

**AREIA
2018**

VINÍCIUS TOMÉ DOS SANTOS SOUZA

Efeito dos anticoagulantes EDTA e heparina sobre a fragilidade osmótica eritrocitária em amostras de sangue de galinhas (*Gallus gallus domesticus*)

Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária, pela Universidade Federal da Paraíba.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Fabiana Satake

**AREIA
2018**

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S729e Souza, Vinicius Tome Dos Santos.

Efeito dos anticoagulantes EDTA e heparina sobre a fragilidade osmótica eritrocitária em amostras de sangue de galinhas (*Gallus gallus domesticus*) / Vinicius Tome Dos Santos Souza. - Areia, 2018.

25 f. : il.

Orientação: Fabiana Satake.

Monografia (Graduação) - UFPB/CCA.

1. anticoagulante, fragilidade osmótica, aves. I. Satake, Fabiana. II. Título.

UFPB/CCA-AREIA

VINÍCIUS TOMÉ DOS SANTOS SOUZA

Efeito dos anticoagulantes EDTA e heparina sobre a fragilidade osmótica eritrocitária em amostras de sangue de galinhas (*Gallus gallus domesticus*)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária pela Universidade Federal da Paraíba.

Aprovado em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Fabiana Satake (Orientador)
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Médica Veterinária. Débora Ferreira dos Santos Angelo
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Dr^a. Tereza Emmanuelle de Farias Rotondano
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

“Dedico a toda minha família, amigos e colegas de trabalho, a todos os que estiveram me apoiando de forma direta e indireta durante esta fase da minha vida, obrigado a todos.”

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, que esteve me ajudando desde antes de eu entrar no curso, me fortalecendo e encorajando a prosseguir, me dando forças para permanecer firme e forte em sua presença.

Agradeço aos meus pais: Vagna Lúcia e José Tomé, que me sustentaram no período em que fiquei longe de casa, pelo meu irmão Janderson e minha irmã Taynara, que estiveram me ajudando também, tanto financeira como com palavras de apoio.

Agradeço a Tia Geralda e Tio Francinaldo, que estiveram me deram abrigo em João Pessoa, como ponto de apoio durante esses cinco anos, me fortaleceram com palavras e me ensinaram muita coisa, princípios que vou levar para toda a vida. Um agradecimento especial aos meus primos Denyson, Aymé e Ryan, somos muito próximos e nossa relação de amizade me ajudou muito quando a pressão ficava maior.

Agradeço a todo o pessoal da ABU, que estiveram sempre presentes em minha vida, me proporcionando momentos de adoração e comunhão com o Senhor nesse complicado contexto que é a universidade.

Agradeço a todos os meus amigos da cidade de Areia, em especial Edivaldo, Givanildo, Lucas, Mateus, Macilon, Hércules e Henrique, que foram um grande ponto de apoio para mim durante o curso.

Agradeço aos meus antigos companheiros de quarto, que me ensinaram muita coisa e me fizeram desfrutar de sua companhia, em especial a José Cruz, Anderson Rodrigo, Otávio Júnior, Thalles e Carlos.

Agradeço à minha namorada Jéssyka, que esteve me ajudando durante esses dias, me dando palavras de conforto e força quando necessário, me proporcionando momentos inesquecíveis também.

Agradeço a todo o pessoal do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da UFPB, em especial a Camila, Débora e Tereza, que me acompanharam, me auxiliaram e construíram conhecimento junto comigo, o início de uma carreira profissional muitas vezes começa na academia, e estas pessoas tiveram participação fundamental nisso.

Agradeço também à minha professora e orientadora Fabiana Satake, suas cobranças e seu nível de exigência me fizeram crescer, e todas as suas instruções serão de importância única na minha vida profissional.

Creio que ainda existem muitos nomes que eu poderia citar nessa folha, porém, eu quero deixar meus sinceros agradecimentos a todos que de alguma forma estiveram me auxiliando e me fornecendo qualquer tipo de apoio nessa fase da minha vida.

RESUMO

V. T. S. Souza, Universidade Federal da Paraíba, julho de 2018. Teste de Fragilidade Osmótica Eritrocitária em galinhas domésticas (*Gallus gallus domesticus*): Fabiana Satake.

O exame clínico em aves é muito limitado e fornece informações inespecíficas sobre o estado de saúde dos animais, neste âmbito, os exames complementares laboratoriais se tornam imprescindíveis na avaliação clínica desse grupo de animais. Além de se utilizar exames laboratoriais na clínica de aves selvagens, pode-se também intensificar o uso dos mesmos na avicultura, já que paralelamente ao crescimento da atividade avícola houve um grande desenvolvimento no que se refere a exames diagnósticos, porém, aspectos ligados a fisiologia e aos exames clínico-laboratoriais tem sido pouco estudado. O hemograma é o exame laboratorial de rotina que objetiva avaliar quantitativa e qualitativamente os glóbulos vermelhos e brancos dos pacientes, dessa forma, é importante que se tenha conhecimento dos fatores não patológicos que podem levar a variações nos parâmetros hematológicos dos animais. Um desses fatores é a escolha do anticoagulante, manuseio e armazenamento de amostras. Os anticoagulantes mais utilizados são o EDTA, a heparina e o citrato de sódio, com formas de ação e diferentes maneiras de alterar os parâmetros hematológicos. Uma das maneiras de avaliar as alterações causadas pelos anticoagulantes é o teste de fragilidade osmótica eritrocitária. Dessa forma, o presente estudo teve o objetivo de avaliar qual anticoagulante tem maior ação no incremento da fragilidade da membrana dos eritrócitos. Foram utilizados 10 animais da espécie *Gallus gallus domesticus*, da linhagem Hy-line brown. Os animais foram submetidos contenção física para a punção da veia basílica e colheita de 2,5 ml, esta amostra foi distribuídas em 5 tubos contendo 15 µl dos diferentes anticoagulantes: Heparina 5000 UI, Na₂EDTA 3%, Na₂EDTA 5%, Na₂EDTA 3% e um tubo sem anticoagulante (controle). Foram retiradas 8 alíquotas de 10 µl dos tubos e distribuídas em tubos contendo 1 ml de diferentes concentrações de solução salina tamponada: 0,00; 0,05; 0,15; 0,25; 0,35; 0,45; 0,55; 0,65. As amostras foram centrifugadas e foi determinada a concentração de hemoglobina no sobrenadante. Não houve diferença significativa entre as soluções, porém, os maiores índices de hemoglobina no sobrenadante foram observados nas amostras acondicionadas com a heparina 5000UI, tendo diferença significativa em relação ao grupo controle, a mesma demonstrando assim maior ação hemolítica sobre as amostras.

Palavra-chave: anticoagulante, fragilidade osmótica, aves.

ABSTRACT

V. T. S. Souza, Federal University of Paraíba, July 2017. Erythrocyte osmotic fragility test in domestic chickens (*Gallus gallus domesticus*): Fabiana Satake

The clinical examination in birds is very limited and provides little information on the health status of the animals because the clinical signs in birds are usually nonspecific. In this context, complementary laboratory tests become essential in the clinical evaluation of this group of animals. In addition to using laboratory tests in the clinic of wild birds, it is also possible to intensify their use in poultry, since in parallel to the growth of poultry activity, there was a great development regarding diagnostic exams, however, aspects related to physiology and clinical-laboratory tests have been poorly studied. The hemogram is the routine laboratory test that aims to quantitatively and qualitatively evaluate the red and white blood cells of the patients, so it is important to know the non-pathological factors that can lead to variations in the haematological parameters of the animals. One of these factors is the choice of handling and storing samples. The most commonly used anticoagulants are EDTA, heparin and sodium citrate, they have different forms of action and different ways of changing haematological parameters. One of the ways to evaluate the changes caused by anticoagulants is the erythrocyte osmotic fragility test. Thus, the present study had the objective of evaluating which anticoagulant has a greater action in the increase of erythrocyte membrane fragility. Ten animals of the species *Gallus gallus domesticus*, of the lineage Hy-line brown, 2 kg of average weight and average age of 19 weeks were used. The animals were punctured from the basilic vein, where 2.5 ml samples were collected and distributed in 5 tubes containing 15 µl of the different anticoagulants: Heparin 5000 IU, EDTA 3%, EDTA 5%, EDTA 3% and a tube without anticoagulant (control). Eight aliquots of 10 µl of the tubes were drawn and dispensed into tubes containing 1 ml of buffered saline in different concentrations: 0.00; 0.05; 0.15; 0.25; 0.35; 0.45; 0.55; 0.65. The samples were centrifuged and hemoglobin was dosed into the supernatant. There was no significant difference between the solutions, however, the highest hemoglobin levels in the supernatant were observed in the samples conditioned with heparin 5000UI, with a significant difference in relation to the control group thus demonstrating a greater hemolytic action on the samples.

Keyword: anticoagulant, osmotic fragility, birds.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Figura 1. Contenção física e punção da veia basílica em <i>Gallus gallus domesticus</i> para teste de fragilidade osmótica eritrocitária (experimento realizado na Universidade Federal da Paraíba) | 17 |
| Figura 2. Da esquerda para a direita, soluções salinas em concentrações decrescentes de 0,65% a 0,00% durante teste de FOE em amostras de sangue de <i>Gallus gallus domesticus</i> (experimento realizado na Universidade Federal da Paraíba) | 19 |
| Figura 3. Concentrações de hemoglobina (mg/dl) no sobrenadante de amostras de sangue de <i>Gallus gallus domesticus</i> diluído em diferentes concentrações de solução salina durante teste de FOE (experimento realizado na Universidade Federal da Paraíba) | 20 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|--|----|
| Quadro 1. Distribuição das amostras em grupos de acordo com a presença e tipo de aditivo utilizado..... | 17 |
| Quadro 2. Concentrações médias de hemoglobina de amostras de diferentes grupos de anticoagulantes e sem aditivos | 18 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético

CHGM – Concentração de Hemoglobina Globular Média

FOE – Fragilidade osmótica eritrocitária

VG – Volume Globular

VGM – Volume Globular Médio

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 12 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA..... | 13 |
| 2.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE CLÍNICA DE AVES..... | 13 |
| 2.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE PATOLOGIA CLÍNICA DE AVES..... | 14 |
| 2.3 USO DE ANTICOAGULANTES NA HEMATOLOGIA DE AVES..... | 15 |
| 2.4 TESTE DE FRAGILIDADE OSMÓTICA ERITROCITÁRIA..... | 16 |
| 3. METODOLOGIA..... | 16 |
| 3.1 ANIMAIS | 16 |
| 3.2 COLHEITA E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS..... | 16 |
| 3.3 TESTE DE FRAGILIDADE OSMÓTICA ERITROCITÁRIA | 18 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 18 |
| 5. CONCLUSÃO..... | 21 |
| 6. REFERÊNCIAS | 22 |

1. INTRODUÇÃO

Em geral, as aves ocupam a posição de presa na cadeia alimentar, o que torna a manifestação física de doenças um sinal de vulnerabilidade, favorecendo assim a predação, essa característica faz com que os animais manifestem sinais clínicos de doença tardiamente (BAHIENSE, 2010). Desta forma o exame clínico em aves é muito limitado e fornece poucas informações sobre o estado de saúde dos animais, pois geralmente os sinais clínicos em aves são inespecíficos (LUMEIJ, 1997 apud SCHMIDT, 2007). Consequentemente as provas laboratoriais se tornam de grande importância para o diagnóstico precoce de doenças (ALVES, 2013).

Dentre os exames laboratoriais realizados na rotina clínica de aves, o hemograma é a principal ferramenta de triagem para o diagnóstico de discrasias sanguíneas (ALMOSNY; MONTEIRO, 2007), monitora o estado geral de saúde do animal e avalia sua capacidade de transportar oxigênio e defender-se contra agentes infecciosos (VOIGT, 2003 apud SCHMIDT, 2007).

Além de se utilizar exames hematológicos na clínica de aves selvagens, também existe a possibilidade de se intensificar o uso dessa ferramenta no diagnóstico de doenças em aves de produção, porém aspectos relacionados à avaliação clínico-laboratorial e à própria fisiologia básica relacionada aos exames laboratoriais são poucos estudados (SCHMIDT, 2007).

Vários fatores podem influenciar nos parâmetros hematológicos das aves, dentre estes estão o armazenamento e manuseio de amostras que podem ter influência significativa nos resultados hematológicos (CAMPBELL, 2015).

Os anticoagulantes mais utilizados na obtenção de amostras sanguíneas de aves são: EDTA e heparina, cada um tendo suas vantagens e desvantagens na conservação de amostras e obtenção de bons resultados (CAMPBELL, 2015). Enquanto a heparina age ativando a antitrombina que inibe atividade de vários fatores de coagulação, o EDTA age quelando o cálcio e outros cátions divalentes como magnésio, cobre e chumbo (STOCKHAM, 2016).

A resistência dos eritrócitos a uma diminuição na concentração de sal em seu ambiente tem sido usada experimentalmente como uma forma de medir sua viabilidade e clinicamente como auxílio diagnóstico. Durante o curso de estudos sobre o armazenamento de sangue total, viu-se a necessidade de determinar com precisão a variação na resistência osmótica das hemácias em amostras armazenadas (PARPART, 1947). Assim, uma das formas de avaliar o efeito de anticoagulantes sobre as hemácias é a realização do teste de fragilidade osmótica eritrocitária

(FOE), que avalia a resistência dos eritrócitos à hemólise, utilizando decrescentes concentrações de solução salina tamponada (JAIN, 1986 apud ALVES, 2013).

Tendo em vista a importância de informações sobre os efeitos adversos desses anticoagulantes no que se refere a armazenamento de amostras e a ausência de tais estudos relacionados à espécie em questão, o presente trabalho teve o objetivo de avaliar a o efeito dos anticoagulantes: Heparina e EDTA sobre o incremento da fragilidade osmótica eritrocitária em hemácias de *Gallus gallus domesticus*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE A CLÍNICA DE AVES

A clínica e a cirurgia de aves são especialidades reconhecidas na medicina veterinária de animais selvagens, sabe-se também que os sinais clínicos que este grupo de animais manifesta em quadros patológicos são inespecíficos, fato que limita a quantidade de informações obtidas ao exame clínico (LUMEIJ, 1997 apud SCHMIDT, 2007).

As aves geralmente ocupam posição de presa na cadeia alimentar, sendo assim, a manifestação de sinais clínicos pode servir como um sinal de vulnerabilidade servindo de gatilho para a predação, conseqüentemente estes animais tendem a manifestar sinais clínicos muito tardiamente (BAHIENSE, 2010), isso reforça a importância dos exames complementares em detectar uma enfermidade em tempo hábil, antes que o animal fique muito debilitado (ALVES, 2013).

Os exames laboratoriais do sangue podem servir como uma ferramenta de extrema importância par auxiliar o médico veterinário no monitoramento da saúde das aves, diagnóstico de enfermidades e avaliação pré-operatória, e também na avaliação da resposta a tratamentos já estabelecidos (SCHMIDT, 2007).

Além de se poder utilizar testes hematológicos e bioquímicos como ferramentas auxiliares na clínica de aves selvagens, seu uso pode ser intensificado na avicultura, pois, junto com o crescimento da atividade avícola, houve grande desenvolvimento de exames diagnósticos e profilaxia das enfermidades aviárias, sem que se tivesse, no entanto, estudos mais aprofundados sobre aspectos básicos relacionados à fisiologia e avaliações clínico-laboratoriais (SCHMIDT, 2007).

2.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE PATOLOGIA CLÍNICA DE AVES

Estudos dos parâmetros hematológicos e bioquímicos são de importância única para o progresso da medicina aviária, com a realização de estudos que permitam interpretar de forma adequada as respostas do organismo e acompanhar o atendimento a campo, para que ocorra melhora no diagnóstico na produção industrial (SCHMIDT, 2007).

O sangue é fundamental para que o equilíbrio entre eletrólitos e água seja mantido, para o controle térmico e funcionamento do sistema imunológico, que é o principal mecanismo de defesa do organismo (VOIGT, 2003 apud SCHMIDT, 2007).

A análise do sangue é uma ferramenta importantíssima para que se obtenha informações sobre o modo de resposta do tecido hematopoiético do animal, permitindo assim o diagnóstico de doenças e o acompanhamento de sua recuperação, tal avaliação fornece informações sobre como o organismo responde à presença de microrganismos ou deficiências nutricionais, pois possibilita a avaliação da condição do animal a partir de um volume relativamente pequeno de amostra (GUERCI, 1985 apud ALVES, 2013). Um laboratório de patologia clínica tem como objetivo principal a realização correta de procedimentos analíticos que auxiliem no diagnóstico da patologia e tratamento do paciente (MOHRI, 2008).

As principais aplicações da hematologia são: monitorar o quadro geral de saúde do animal e avaliar sua capacidade de transportar oxigênio e avaliar sua capacidade de defender-se contra agentes infecciosos (VOIGT, 2003 apud SCHMIDT, 2007). A hematologia tem como objetivo estabelecer um diagnóstico, definir linhas, orientar o prognóstico e o tratamento de doenças. O hemograma é um exame laboratorial de rotina que avalia glóbulos brancos e vermelhos de forma qualitativa e quantitativa (SCHMIDT, 2007). As análises hematológicas também ajudam o médico veterinário a diagnosticar doenças de quadro subclínico, sendo, em muitos casos, utilizado pouco na prática na medicina veterinária de aves por deficiência de observações sobre os valores hematológicos e bioquímicos normais do sangue das espécies animais, impossibilitando uma adequada observação dos resultados obtidos (BIRGEL, 1982 apud SCHMIDT, 2007).

A hematologia de aves tem uma abordagem semelhante à de humanos e outros mamíferos, porém, algumas diferenças fazem com que algumas adaptações sejam necessárias. Em geral, os eritrócitos maduros de aves são maiores do que os dos mamíferos, são elípticos e possuem um núcleo centralizado e também elíptico (CAMPBELL, 2015).

Os valores fisiológicos dos parâmetros hematológicos das aves podem ser influenciados por diversos fatores intrínsecos e extrínsecos tais como: estado nutricional, sexo, idade, habitat,

estação do ano, estado reprodutivo, trauma, criação e stress ambiental (CAMPBELL, 2015), por isso, é importante que se conheça essas variações antes que se interprete os resultados de exames solicitados (SCHMIDT, 2007). Dentre estes fatores está a escolha do método de manuseio e o armazenamento das amostras, que tem influência significativa nos resultados (CAMPBELL, 2015).

2.3 USO DE ANTICOAGULANTES NA HEMATOLOGIA DE AVES

Hatting & Smith (1976) compararam os efeitos de EDTA e heparina sobre amostras de sangue de aves e répteis e observaram que amostras colhidas com EDTA e heparina tiveram hematócritos similares, porém as amostras colhidas com EDTA tiveram valores de VGM e grau de hemólise maiores. Estudos recomendam que o esfregaço seja feito no momento da colheita caso o sangue seja colhido com heparina para que se eliminem alterações na morfologia celular (ZINKL, 1986 apud SCHMIDT, 2007). Fourie (1977 apud SABINO, 2010) afirma que a heparina é o anticoagulante mais adequado para pombos, porém Thrall (2015) assegura que este anticoagulante pode causar morfologia celular ruim nos esfregaços. Campbell (2015) também afirma que o EDTA pode ocasionar anticoagulação incompleta em amostras de sangue de alguns grupos de aves.

Pennock & Jones (1966) comparam os efeitos da heparina e do EDTA sobre amostras de sangue humano e, de acordo com seus resultados o uso do EDTA resultou em valores de Volume Globular Médio (VGM) e da Concentração de Hemoglobina Globular Média (CHGM) falsamente diminuídos, podendo assim comprometer o diagnóstico. Segundo este estudo, amostras de sangue colhidas com EDTA em concentrações acima de 2 mg/ml tem significativa diminuição do Volume Globular (VG).

Embora alguns autores afirmem que o EDTA tenha ação hemolítica e consequentemente altere alguns parâmetros hematológicos, Thrall (2015) diz que este anticoagulante tem a vantagem de preservar a morfologia e evitar aglomerados de leucócitos.

Segundo Hatting (1975), o EDTA e a heparina podem ser utilizados sem muitos efeitos adversos desde que os mesmos estejam em concentrações ideais.

Em humanos, acredita-se que a hemólise causada pelo EDTA resulte de seu efeito osmótico sobre a membrana das hemácias, cuja hemólise aumenta de maneira diretamente proporcional à concentração do anticoagulante (BLAXHALL, 1973 apud SABINO, 2010), o EDTA altera a membrana dos eritrócitos humanos modificando sua estrutura, o que resulta em hemólise osmótica (PINTERIC, 1975). Segundo resultados obtidos por Pádua (2012), o EDTA

tripotássico a 10% determina a ocorrência de hemólise em amostras de uma espécie que possui hemácias nucleadas.

2.4 TESTE DE FRAGILIDADE OSMÓTICA ERITROCITÁRIA

Durante o curso de estudos sobre o armazenamento de sangue total, tornou-se necessário determinar com precisão a variação na resistência osmótica das hemácias em amostras armazenadas (PARPART, 1947). Assim, uma das formas de avaliar o efeito de anticoagulantes sobre as hemácias é a realização do teste de fragilidade osmótica eritrocitária. Neste teste avalia-se a resistência dos eritrócitos à hemólise, utilizando-se soluções tamponadas de NaCl em água destilada em concentrações decrescentes (JAIN, 1986 apud ALVES, 2013).

Segundo Perk (1964, apud ELIAS, 2004), a fragilidade osmótica é influenciada por vários fatores como a forma, o volume e o tamanho da hemácia, o tipo e a quantidade de hemoglobina, as diferenças na viscoelasticidade das membranas e na composição química e estrutural das mesmas.

3 METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS

Após consentimento do tutor foram utilizadas amostras de sangue de 10 galinhas (*Gallus gallus domesticus*) da linhagem Hy-line Brown provenientes de criatório particular, os animais pesavam 2 quilos em média, e tinha a idade média de 19 semanas, todos os animais se apresentavam sem sinais clínicos de doença no momento do experimento. Os animais foram mantidos em ambiente com cama de pó de serra, onde a manutenção era feita a cada dois dias, receberam alimento e água *ad libitum* e foram submetidos a jejum pelo período de 8 horas até o momento da colheita.

3.2 COLHEITA E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

Os animais foram contidos mecanicamente, as amostras foram colhidas por punção da veia basílica, utilizando seringas estéreis de 5 ml e agulhas hipodérmicas como observado na Figura 1, sendo colhido um volume total de 2,5 ml por animal a ser utilizado no teste de fragilidade.

Figura 1: Contenção física e punção da veia basílica em *Gallus gallus domesticus* para teste de fragilidade osmótica eritrocitária (experimento realizado na Universidade Federal da Paraíba).



Fonte: Acervo pessoal

As amostras sanguíneas de cada animal foram distribuídas em alíquotas de 0,5 ml por 5 tubos de polipropileno com capacidade para 1,5ml, o primeiro tubo não continha anticoagulante (controle) e os outros quatro continham respectivamente 15µl dos seguintes anticoagulantes: Na₂EDTA 3%, Na₂EDTA 5%, Na₂EDTA 10% e o último contendo Heparina 5000UI. Para melhor representação, os tubos foram nomeados como grupos seguidos de letras, sendo o Grupo A o de tubos sem anticoagulante, o Grupo B composto por tubos contendo Na₂EDTA 3%, o Grupo C composto de tubos contendo Na₂EDTA 5%, o Grupo D o de tubos contendo Na₂EDTA 10% e o Grupo E composto por tubos contendo Heparina 5000UI. A distribuição dos grupos é melhor evidenciada no Quadro 1.

Quadro 1. Distribuição das amostras em grupos, de acordo com a presença e tipo de aditivo utilizado.

| Tubos | Anticoagulante |
|---------|--------------------------|
| Grupo A | Sem anticoagulante |
| Grupo B | Na ₂ EDTA 3% |
| Grupo C | Na ₂ EDTA 5% |
| Grupo D | Na ₂ EDTA 10% |
| Grupo E | Heparina 5000UI |

3.3 TESTE DE FRAGILIDADE OSMÓTICA ERITROCITÁRIA

De cada tubo foram retiradas oito alíquotas de 10 µl, sendo imediatamente distribuídas em oito tubos de ensaio, cada um contendo 1 ml de solução salina tamponada preparada segundo Parpart *et al.* (1947) em oito concentrações diferentes, a saber: 0,65; 0,55; 0,45; 0,35; 0,25; 0,15; 0,05 e 0,00 (água destilada).

Em seguida os tubos ficaram em repouso por 30 minutos, sendo as soluções homogeneizadas a cada 10 minutos, após a terceira homogeneização os tubos foram centrifugados a 327,6 – 582,4 g por cinco minutos, em seguida realizada a determinação da concentração de hemoglobina no sobrenadante das soluções pelo método de cianometahemoglobina, sendo a leitura realizada em aparelho semiautomático de análises bioquímicas da marca Termoplate, no comprimento de onda 540 nm, segundo a metodologia adaptada de ISHIKAWA (2010).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foi constatada diferença significativa ($p = 0,99$) entre as concentrações de hemoglobina entre os animais e entre as diferentes concentrações de solução salina tamponada, porém, houve diferença significativa na liberação de hemoglobina no sobrenadante decorrente da hemólise entre os diferentes grupos de anticoagulantes. As médias das concentrações de hemoglobina dosadas no sobrenadantes dos tubos centrifugados e seus respectivos anticoagulantes encontram-se evidenciadas no Quadro 2.

Quadro 2. Concentrações médias de hemoglobina de amostras de diferentes tipos de anticoagulantes e sem aditivos.

| Anticoagulante | Hemoglobina (mg/dL) |
|----------------|---------------------|
| Grupo A | 16,95 b |
| Grupo B | 17,23 ab |
| Grupo C | 17,27 ab |
| Grupo D | 17,34 ab |
| Grupo E | 18,62 a |

*Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas são iguais entre si Tuckey ($p = 0,032$).

Embora não se tenha observado diferença estatisticamente significativa pelo teste de Tuckey ($p = 0,99$) nos resultados das dosagens bioquímicas, a hemólise pôde ser observada visualmente a partir da solução salina a 0,45%, o que pode ser melhor evidenciado na Figura 2.

Figura 2. Da esquerda para a direita, soluções salinas em concentrações decrescentes de 0,65% a 0,00%. Durante teste de FOE em amostras de sangue de *Gallus gallus domesticus* (experimento realizado na Universidade Federal da Paraíba).

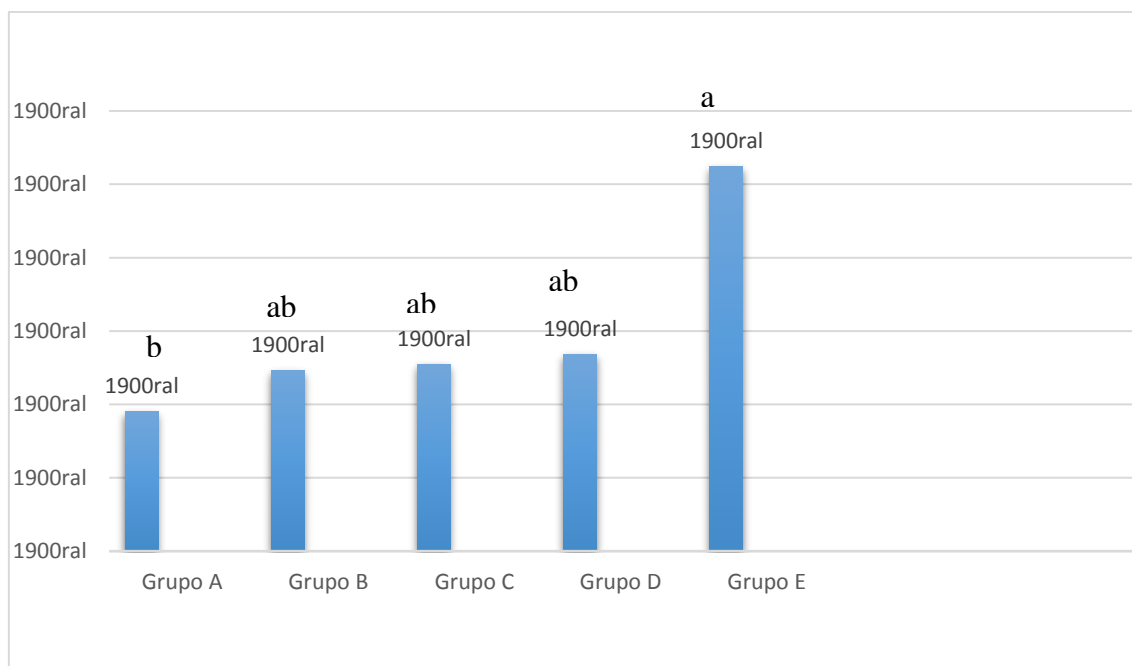


Fonte: Acervo pessoal.

Como pôde ser observado, as maiores concentrações de hemoglobina foram constatadas no sobrenadante do Grupo E, seguido do Grupo D, depois do Grupo C, Grupo B e por último do Grupo A.

Não foi constatada diferença significativa entre a média das concentrações de hemoglobina dos grupos A, B, C e D, enquanto que a média das concentrações de hemoglobina do Grupo E tiveram diferença significativa em relação ao Grupo A, embora não tenha diferido significativamente das médias dos grupos B, C e D, o que é melhor evidenciado na Figura 3.

Figura 3. Concentrações de hemoglobina (mg/dl) no sobrenadante de amostras de sangue de *Gallus gallus domesticus* diluído em diferentes concentrações de solução salina durante teste de FOE (experimento realizado na Universidade Federal da Paraíba).



*Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas linhas são iguais entre si pelo teste de Tuckey ($p = 0,032$).

Fonte: Acervo pessoal

Embora Ishikawa *et al.* (2010) tenha encontrado um maior incremento na fragilidade osmótica dos eritrócitos com a utilização de EDTA independente da concentração testada (3, 5 e 10%) em comparação com a heparina nas amostras de sangue surubim híbrido (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *P. corruscans*), vale ressaltar que a concentração de heparina utilizada foi bem menor (100UI). Pádua *et al.* (2011) também encontrou maior aumento na sensibilidade osmótica na membrana dos eritrócitos com o uso de EDTA na concentração de 10% em *Colossoma macropomum* em comparação com a heparina, porém os resultados do presente experimento mostram o contrário, pode-se supor que a diferença nos resultados se deva ao fato dos estudos terem sido feitos em diferentes espécies.

Sabino *et al.* (2010) também encontrou maior incremento hemolítico em amostras de avestruzes (*Struthio camelus* L.) acondicionadas com EDTA em relação à heparina, porém, o mesmo utilizou uma proporção de 10UI de heparina por ml de sangue, já no presente estudo foi utilizada uma proporção de 150 UI de heparina por ml de sangue.

Os resultados do presente experimento corroboram com os resultados de Braz (2017), onde foi encontrado maior grau de hemólise em amostras da espécie *Numida meleagris*

armazenadas com heparina. É importante ressaltar que os anticoagulantes podem ter efeitos diferentes nas amostras sanguíneas de diferentes grupos aviários (CAMPBELL, 2010).

Estudos relatam que o efeito hemolítico do EDTA está ligado ao seu mecanismo de ação, pois com a quelação do cálcio, que é o íon responsável pela ativação da bomba de sódio e potássio, ocorre a livre entrada de água para o interior da célula promovendo seu intumescimento e consequente lise (JAIN, 1993), porém, dentre as fontes consultadas não foram encontrados detalhes sobre o mecanismo pelo qual a heparina pode causar maior sensibilidade da membrana das hemácias.

O maior incremento na sensibilidade da membrana dos eritrócitos pode ser devido à alta proporção Heparina/sangue, já que em outros estudos com aves foi utilizada uma proporção significativamente menor do anticoagulante.

5. CONCLUSÃO

Tendo em vista as circunstâncias metodológicas e de recursos pelos quais este experimento foi realizado, foi possível concluir que a heparina 5000 UI tem maior incremento na fragilidade osmótica da membrana de hemácias da espécie *Gallus gallus domesticus* quando comparada ao EDTA nas concentrações de 3, 5 e 10% e que essa concentração do anticoagulante pode ter efeitos adversos nas amostras de sangue da espécie, visto a diferença significativa nas concentrações de hemoglobina no sobrenadante das soluções centrifugadas quando se comparou as amostras acondicionadas com os diferentes anticoagulantes e o grupo controle.

6. REFERÊNCIAS

- ALMOSNY N.R.P.; MONTEIRO A.O. Patologia Clínica. In: CUBAS Z.S.; SILVA J.C.R.; CATÃO-DIAS J.L. **Tratado de Animais Selvagens** - Medicina Veterinária. 1º ed. São Paulo: Roca, 2007.
- ALVES, G.M, Efeito dos anticoagulantes – Citrato de sódio, EDTA-K₃ e heparina sódica nas análises hematimétricas e bioquímicas em araras Canindé (*Ara ararauna*), Tigre d'água (*Trachemys scripta*) e pacamãs (*Lophiosilurus alexandri*). 85 f. **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, 2013.
- BAHIENSE C. R, Determinação de Parâmetros Hematológicos e Bioquímicos de Arara Canindé (*Ara Ararauna*), no Estado Do Rio De Janeiro. 42 f. **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária) – Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2010.
- BIRGEL, E.H. Hematologia Clínica Veterinária. In: BIRGEL, E.H.; BENESI, F.J. **Patologia Clínica Veterinária**. São Paulo, SPMV, 1982.
- BLAXHALL, P.C, 1973. Error in haematocrit value produced by inadequate concentration of thilenediamine tetra-acetate. **Journal of Fish Biology** 5: 767–769, novembro de 1973.
- BRAZ, C. H. S; SOUZA, Y. C; SANTOS, A. S; MALAFAIA, G; WERTHER, K; ALVES-JUNIOR, J. R. F. Efeito da heparina e do EDTA no perfil hematológico de galinhas-d'angola (*numida meleagris*) de plumagem preta. In: CONGRESSO ESTADUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA IF GOIANO. 5. 27 a 28 de setembro de 2017. Urutaí-GO, **Anais Eletrônicos**, Urutaí, GO, 2017. Disponível em: <<https://even3storage.blob.core.windows.net/anais/61708.pdf>> Acesso em: 02 jul. 2017.
- CAMPBELL, T.W. Hematologia das aves. In: THRALL, M.A. **Hematologia e Bioquímica clínica Veterinária**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2015.
- ELLIAS, F; LUCAS, S. R. R; HAGIWARA, M. K; KOGIKA, M.M; MARANDOLA, R. M. S, Fragilidade osmótica eritrocitária em gatos acometidos por hepatopatias e gatos com insuficiência renal. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 2, 413-418, março/abril de 2004.
- FOURIE, F.R. Effects of anticoagulants on the haematocrit, osmolarity and pH of avian blood. **Poultry Science**, 56:1842– 1846, novembro de 1977.
- GUERCI, A. **Métodos de análisis clínicos y suinterpretación**. 3º ed. Buenos Aires: El Ateneo, 1985.
- HATTINGH, J. Heparin and Ethylenediamine Tetra-Acetate as anticoagulants for fish blood. **Plügers Arch**, v. 355, 347-352, dezembro de 1975.
- HATTINGH, J.; SMITH, E.M. Anticoagulants for avian and reptilian blood: heparin and EDTA. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, v. 363(3): 267 – 269, janeiro de 1976.

ISHIKAWA, M. M; PÁDUA, S. B; SATAKE, F; HISANO, H.; JERÔNIMO, G. T; MARTINS, M.L. Heparina e Na₂EDTA como anticoagulantes para surubim híbrido (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *P. corruscans*): eficácia e alterações hematológicas. **Ciência Rural**. V. 40(7), 1557-1561, junho de 2010.

JAIN, N. C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 4^{ed}. Lea and Febiger, Washington square, Philadelphia, USA, Lea and Febiger, 1986.

JAIN, N.C. Coagulation and its disorders. In: Jain NC (Ed.) **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia, Lea & Fabiger, 1993.

LUMEIJ, J.T. Avian Clinical Biochemistry. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5th edition. San Diego, Academic Press, 1997.

MOHRI, M.; SHAKERI, H; LOTFOLLAH ZADEH, S. Effects of common anticoagulants (heparin, citrate and EDTA) on routine plasma biochemistry of cattle. **Comparative Clinical Pathology**, v.16, n.3, p.207-209, august, 2007.

PÁDUA, S.B.; PILARSKI, F. Heparina e K₃EDTA como anticoagulantes para tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1816). **Acta Amazônica**, v.42 (2), p.293-298, fevereiro de 2011.

PARPART, A.K. The osmotic resistance (fragility) of human red cells. **Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor, v.26, n.4, p.636-640, august, 1947.

PENNOCK, C.A & JONES, K.W, 1966. Effect of ethylene-diaminetetracetic-acid (dipotassium salt) and heparin on the estimation of packed cell volume. **Journal of Clinical Pathology**, v.19, p. 196– 199.

PERK, K.; FREI, Y.F.; HERZ, A, 1964. Osmotic fragility of red blood cells of young and mature domestic and laboratory animals. **American Journal Veterinary Research**, v.25, p.1241-1248.

PINTERIC, L.; MANERY, J.F; CHAUDRY, I.H & MADALPALLIMATTAM G, 1975, The effect of EDTA, cations, and various buffers on the morphology of erythrocyte membranes: an electronmicroscopic study. **Blood**, v.45:709–724.

SABINO, A.J; SILVIA C.T.; PAULO C.C. Comparação do efeito do ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e da heparina sobre os eritrócitos de avestruzes (*Struthio camelus* L.). **Revista Ceres**, v.57, p. 338-342, maio – junho de 2010.

SCHMIDT, E. M. S.; LOCATELLI-DITRICH, R.; SANTIN, E.; PAULLILO, A. C. Patologia Clínica em aves de produção – uma ferramenta para monitorar a sanidade avícola – Revisão. **Archives of Veterinary Science**, v 12, n.3. p.9-20, novembro de 2007.

STOCKHAM, S.L; SCOTT, M.A. **Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária**. GUANABARA KOOGAN, Rio de Janeiro, 2016.

VOIGT, G.L. 2003. **Conceptos y Técnicas Hematológicas para Técnicos Veterinarios**. Zaragoza, Editorial ACRIBIA. 144p.

ZINKL, J. G. 1986. Avian Hematology. **In:** JAIN, N.C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 4th ed, Philadelphia, Lea & Febiger, p.256-273.

.